

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 12 107.5

**Anmeldetag:** 14. März 2001

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

**Priorität:** 04.11.2000 DE 100 54 748.6

**IPC:** C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. Oktober 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

U. - 16



## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mechthild RIEPING et al.

GAU:

SERIAL NO: 10/076,416

EXAMINER:

#5

FILED: FEBRUARY 19, 2002

FOR: PROCESS FOR THE FERMENTATIVE PREPARATION OF L-AMINO ACIDS USING STRAINS OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY

## REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS  
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	101 12 107.5	MARCH 14, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .  
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and  
(B) Application Serial No.(s)
- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLOON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

\_\_\_\_\_  
Norman F. Oblon  
Registration No. 24,618\_\_\_\_\_  
William E. Beaumont  
Registration No. 30,996

22850

Tel. (703) 413-3000  
Fax. (703) 413-2220  
(OSMMN 10/98)

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, L-  
5 L-Lysin und L-Valin, unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das *poxB*-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, L-Lysin und L-  
10 L-Valin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere *Escherichia coli* (E.  
15 *coli*) und *Serratia marcescens*, herzustellen. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der  
20 Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder  
30 auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-

Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht.

### 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, L-Lysin und L-Valin, bereitzustellen.

### 10 Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Threonin produzieren, und in denen die für das Enzym Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nukleotidsequenz (poxB-Gen) abgeschwächt wird.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

30 a) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest das poxB-Gen abgeschwächt wird,

- b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und
  - c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.
- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um
- 10 Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia
- 15 insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- 20 Escherichia coli TF427  
Escherichia coli H4578  
Escherichia coli KY10935  
Escherichia coli VNIIgenetika MG442  
Escherichia coli VNIIgenetika M1  
Escherichia coli VNIIgenetika 472T23
- 25 Escherichia coli BKIIM B-3996  
Escherichia coli kat 13  
Escherichia coli KCCM-10132

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind

30 beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21  
Serratia marcescens TLr156  
Serratia marcescens T2000

- L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -
- 5 Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen  $\alpha$ -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie
  - 10 beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich
  - 15 Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen
  - 20 L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I
  - 25 bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-
  - 30 Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und
  - 35 Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere Ausschaltung des für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierenden *poxB*-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren, 5 insbesondere L-Threonin produzieren.

Darüber hinaus wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere Ausschaltung des für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierenden *poxB*-Gens geringere Konzentrationen des 10 unerwünschten Nebenproduktes Essigsäure bilden.

Die Nukleotidsequenz des *poxB*-Gens von *Escherichia coli* wurde von Grabau und Cronan (Nucleic Acids Research. 14 (13), 5449-5460 (1986)) publiziert und kann ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453 - 1462 (1997) 15 publizierten Genomsequenz von *Escherichia coli* unter der Accession Number AE000188 entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des *poxB*-Gens von *Escherichia coli* ist in SEQ ID No. 1 und die Aminosäuresequenz des dazugehörigen Genproduktes in SEQ ID No. 2 dargestellt.

20 Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen *poxB*-Gene können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele des *poxB*-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) 25 ergeben.

Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression des *poxB*-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen 30 kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch

Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren.

- 5 Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15, 58-64 (1999), Franch und Gerdés (Current Opinion in Microbiology 3, 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, 15 Weinheim, Deutschland, 1990).

- Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, 5511-5515 (1998), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839 (1991) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

- Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“),

die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur 5 Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und 10 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen das poxB-Gen von Escherichia coli durch ortsspezifische Mutagenese 15 abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden kann, ist das Plasmid pMAK705ΔpoxB (Figur 1). Es enthält neben Resten von Polylinkersequenzen lediglich einen Teil der 5'- und einen Teil der 3'-Region des poxB-Gens. Ein 340 bp langer Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Die 20 Sequenz dieser für die Mutagenese des poxB-Gens einsetzbaren DNA ist in SEQ ID No. 3 dargestellt.

Die Deletionsmutation des poxB-Gens kann durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al. 25 (Journal of Bacteriology 174, 4617 – 4622 (1989)) beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of 30 Bacteriology 1999, 7143-7148 (1999)) oder die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182, 842-847 (2000)) können gleichfalls benutzt werden.

Nach erfolgtem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm die in SEQ ID No. 4 dargestellte Form des  $\Delta$ poxB-Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen im poxB-Gen oder 5 Mutationen, die die Expression des poxB-Gens betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie 10 Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des poxB-Gens ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-15 Phosphat zu verstärken.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man 20 beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

25 So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- 30 • das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-19 831 609),

- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231:332 (1992)),
  - das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31:279-283 (1984)),
  - 5 • die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158:647-653 (1986)),
  - das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),
  - 10 • das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (DE 100 348 33.5),
  - das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
  - 15 • das für den Threoninexport kodierende thrE-Gen von *Corynebacterium glutamicum* (DE 100 264 94.8) und
  - das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983))
- verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
- 20 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *poxB*-Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology 169, 4716-4721 (1987)),
  - 25 • das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Vogel et al., Archives in Microbiology 149, 36-42 (1987)),

- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa  
(Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA),
  - das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP  
5 (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und
  - das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (Medina et al. (Journal of Bacteriology 172, 7151-7156 (1990))
- 10 abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des poxB-Gens unerwünschte Nebenreaktionen 15 auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im 20 batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die 25 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den 30 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der

American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, 5 Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. 10 Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff 15 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, 20 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumdihydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können 25 essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder 30 in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure

- oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem 5 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise 10 bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.
- 15 Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie 20 bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes DH5 $\alpha$ /pMAK705 wurde am 12. September 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, 25 Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag als DSM 13720 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes MG442 $\Delta$ poxB wurde am 02. Oktober 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, 30 Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag als DSM 13762 hinterlegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie z.B. L-Threonin, L-

Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

- 5 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung werden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation 10 von *Escherichia coli* wird, wenn nicht anders beschrieben, nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA (1989) 86: 2172-2175) durchgeführt.

Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen 15 und Transformanten ist 37°C. Bei dem Genaustauschverfahren nach Hamilton et. al werden Temperaturen von 30°C und 44°C verwendet.

#### Beispiel 1

##### Konstruktion der Deletionsmutation des *poxB*-Gens

- 20 Teile der 5'- und 3'-Region des *poxB*-Gens werden aus *Escherichia coli* K12 unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukletidsequenz des *poxB*-Gens in *E. coli* K12 MG1655 (SEQ ID No. 1) werden folgende 25 PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

*poxB*'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

*poxB*'5'-2: 5' - AGGCCTGGAATAACGCAGCAGTTG - 3'

*poxB*'3'-1: 5' - CTGCGTGCATTGCTTCCATTG - 3'

30 *poxB*'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 500 Basenpaare (bp) grosses DNA-Fragment aus der 5'-Region des 5 poxB-Gens (mit poxB1 bezeichnet) und ein ca. 750 bp grosses DNA-Fragment aus der 3'-Region des poxB-Gens (mit poxB2 bezeichnet) kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic 10 Press) mit der Taq-DNA-Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland) amplifiziert werden. Die PCR-Produkte werden den Herstellerangaben entsprechend jeweils mit dem Vektor pCR2.1TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und in den E. coli Stamm TOP10F' 15 transformiert.

Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgt auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist. Nach der Plasmid DNA Isolierung wird der Vektor pCR2.1TOPOpoxB1 mit den Restriktionsenzymen Ecl136II und XbaI gespalten und das 20 poxB1-Fragment nach der Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Der Vektor pCR2.1TOPOpoxB2 wird nach der Plasmid DNA Isolierung mit den Enzymen EcoRV und XbaI gespalten und mit dem isolierten poxB1-Fragment ligiert. 25 Der E. coli Stamm DH5 $\alpha$  wird mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Nach der Plasmid DNA Isolierung werden durch die Kontrollspaltung mit den Enzymen HindIII und XbaI solche 30 Plasmide nachgewiesen, in denen die in SEQ ID No. 3 dargestellte mutagene DNA Sequenz kloniert vorliegt. Eines der Plasmide wird als pCR2.1TOPO $\Delta$ poxB bezeichnet.

Beispiel 2

## Konstruktion des Austauschvektors pMAK705ΔpoxB

Das in Beispiel 1 beschriebene poxB-Allel wird aus dem Vektor pCR2.1TOPOΔpoxB nach der Restriktion mit den Enzymen 5 HindIII und XbaI und Auf trennung im 0,8%igen Agarosegel isoliert und mit dem Plasmid pMAK705 (Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622), das mit den Enzymen HindIII und XbaI verdaut wurde, ligiert. Der Ligationsansatz wird in DH5 $\alpha$  transformiert und Plasmid 10 tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20  $\mu$ g/ml Chloramphenicol versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wird nach Plasmid DNA Isolierung und Spaltung mit den Enzymen HindIII und XbaI nachgewiesen. Der entstandene Austauschvektor pMAK705ΔpoxB (= 15 pMAK705deltapoxB) ist in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3

## Ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens in dem E. coli Stamm MG442

Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der 20 Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.

Für den Austausch des chromosomalen poxB-Gens gegen das 25 Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird MG442 mit dem Plasmid pMAK705ΔpoxB transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden 30 (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

poxB'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

poxB'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC - 3'

Der erhaltene Stamm wird als MG442ΔpoxB bezeichnet.

Beispiel 4

5 Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442ΔpoxB

MG442ΔpoxB wird auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung vermehrt: 3,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar. Die Bildung von L-Threonin wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmödium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g/l CaCO<sub>3</sub>, 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem

15 ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 µl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,03 g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,018 g/l MnSO<sub>4</sub>·1H<sub>2</sub>O, 30 g/l CaCO<sub>3</sub>, 20 g/l Glucose) überimpft und für 48 Stunden bei 20 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

25 Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 $\Delta$ poxB	4,9	2,6

Beispiel 5

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm

- 5 MG442 $\Delta$ poxB/pMW218gdhA

## 5.1 Amplifizierung und Klonierung des gdhA-Gens

Das Glutamat-Dehydrogenase-Gen aus Escherichia coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert.

- 10 Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das gdhA-Gen in E. coli K12 MG1655 (GenBank: Accession Nr. AE000270 und Nr. AE000271) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

Gdh1: 5' - TGAACACTTCTGGCGGTACG - 3'

15 Gdh2: 5' - CCTCGGCGAAGCTAATATGG - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 2150 bp großes DNA-Fragment, das den gdhA-Kodierbereich und ca.

- 20 350 bp 5'-flankierende und ca. 450 bp 3'-flankierende Sequenzen umfaßt, kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, USA) amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird in das

Plasmid pCR2.1TOPO kloniert und in den E. coli Stamm TOP10 transformiert (Invitrogen, Leek, Niederlande, Produktbeschreibung TOPO TA Cloning Kit, Cat. No. K4500-01). Die erfolgreiche Klonierung wird durch Spaltung des 5 Plasmids pCR2.1TOPOgdhA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und EcoRV nachgewiesen. Dazu wird die Plasmid DNA mittels des „QIAprep Spin Plasmid Kits“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert und nach der Spaltung in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

10 5.2 Klonierung des gdhA-Gens in den Plasmidvektor pMW218

Das Plasmid pCR2.1TOPOgdhA wird mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und das 2,1 kbp große gdhA-Fragment mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Das Plasmid pMW218 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym EcoRI gespalten und mit dem gdhA-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 $\alpha$  wird mit dem Ligationsansatz transformiert und pMW218 tragende Zellen durch Ausplattieren auf LB Agar (Lennox, Virology 15 1955, 1: 190), der mit 20 $\mu$ g/ml Kanamycin versetzt ist, 20 selektioniert.

Die erfolgreiche Klonierung des gdhA-Gens kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit EcoRI und EcoRV nachgewiesen werden. Das Plasmid wird als pMW218gdhA 25 (Figur 2) bezeichnet.

5.3 Herstellung des Stammes MG442 $\Delta$ poxB/pMW218gdhA

Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 $\Delta$ poxB und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW218gdhA transformiert und 30 Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20  $\mu$ g/ml Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 $\Delta$ poxB/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA.

## 5.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 $\Delta$ poxB/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA wird wie in Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das Vorkulturmedium werden bei diesen beiden Stämmen zusätzlich mit 20  $\mu$ g/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

Tabelle 2

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 $\Delta$ poxB	4,9	2,6
MG442/pMW218gdhA	5,6	2,6
MG442 $\Delta$ poxB/pMW218gdhA	5,5	2,9

10

Beispiel 6

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442 $\Delta$ poxB/pMW219rhtC

## 6.1 Amplifizierung des rhtC-Gens

- 15 Das rhtC-Gen aus Escherichia coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das rhtC-Gen in E. coli K12 MG1655 (GenBank: Accession Nr. AE000458, Zakataeva et al. (FEBS Letters 452, 228-232 (1999)) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

RhtC1: 5' - CTGTTAGCATGGCGAGGCA - 3'

RhtC2: 5' - GCATGTTGATGGCGATGACG - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 5 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 800 bp großes DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega 10 Corporation, Madison, USA) amplifiziert werden.

#### 6.2 Klonierung des rhtC-Gens in den Plasmidvektor pMW219

Das Plasmid pMW219 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym SmaI gespalten und mit dem rhtC-PCR-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 $\alpha$  wird mit dem 15 Ligationsansatz transformiert und pMW219 tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20  $\mu$ g/ml Kanamycin supplementiert ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit KpnI, HindIII und NcoI nachgewiesen werden. Das Plasmid 20 pMW219rhtC ist in Figur 3 dargestellt.

#### 6.3 Herstellung des Stammes MG442 $\Delta$ poxB/pMW219rhtC

Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 $\Delta$ poxB und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW219rhtC transformiert und Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20  $\mu$ g/ml 25 Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 $\Delta$ poxB/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC.

#### 6.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 $\Delta$ poxB/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC wird wie in 30 Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das

Vorkulturmedium werden bei diesen beiden Stämmen zusätzlich mit 20 µg/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

5

Tabelle 3

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 $\Delta$ poxB	4,9	2,6
MG442/pMW219rhtC	5,2	2,9
MG442 $\Delta$ poxB/pMW219rhtC	5,4	3,9

#### Beispiel 7

Ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens in dem E. coli Stamm TOC21R

- 10 Der L-Lysin produzierende E. coli Stamm pDA1/TOC21R ist in der Patentanmeldung F-A-2511032 beschrieben und bei der Collection Nationale de Culture de Microorganisme (CNCM, Institut Pasteur, Paris, Frankreich) unter der Nummer I-167 hinterlegt. Der Stamm und der plasmidfreie Wirt sind
- 15 ebenfalls bei Dause-Le Reverend et al. (European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 15:227-231 (1982)) unter der Bezeichnung TOCR21/pDA1 beschrieben.

- Von Stamm pDA1/TOC21R wird nach Kultur im Antibiotika-freien LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein
- 20 Derivat isoliert, das das Plasmid pDA1 nicht mehr enthält. Der entstandene Stamm ist Tetracyclin-sensitiv und wird als TOC21R bezeichnet.

Für den Austausch des chromosomalen poxB-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird TOC21R mit dem Plasmid pMAK705ΔpoxB (Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989)

5 Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

10 poxB'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

poxB'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC - 3'

Der erhaltene Stamm wird als TOC21RΔpoxB bezeichnet.

#### Beispiel 8

Herstellung von L-Lysin mit dem Stamm TOC21RΔpoxB

15 Die Bildung von L-Lysin durch die Stämme TOC21RΔpoxB und TOC21R wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/l 20  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g/l  $\text{CaCO}_3$ , 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250  $\mu\text{l}$  dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g/l 25  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,018 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ , 30 g/l  $\text{CaCO}_3$ , 20 g/l Glucose, 25 mg/l L-Isoleucin und 5 mg/l Thiamin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, 30 Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Lysin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem

Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 4 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

5

Tabelle 4

Stamm	OD (660 nm)	L-Lysin g/l
TOC21R	1,0	1,17
TOC21R $\Delta$ poxB	1,0	1,29

#### Beispiel 9

Ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens in dem E. coli Stamm B-1288

10 Der L-Valin produzierende E. coli Stamm AJ 11502 ist in der Patentschrift US-A-4391907 beschrieben und bei dem National Center for Agricultural Utilization Research (Peoria, Illinois, USA) als NRRL B-12288 hinterlegt.

Von Stamm AJ 11502 wird nach Kultur im Antibiotika-freien  
15 LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein plasmidfreies Derivat isoliert. Der entstandene Stamm ist Ampicillin-sensitiv und wird als AJ11502kur bezeichnet.

Für den Austausch des chromosomalen poxB-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird AJ11502kur mit dem  
20 Plasmid pMAK705 $\Delta$ poxB (Siehe Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and

Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

poxB'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

poxB'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC - 3'

- 5 Der erhaltene Stamm wird als AJ11502kurΔpoxB bezeichnet. Aus Stamm NRRL B-12288 wird das in der Patentschrift US-A-4391907 beschriebene Plasmid isoliert, welches die genetische Information bezüglich der Valin-Produktion trägt. Der Stamm AJ11502kurΔpoxB wird mit diesem Plasmid 10 transformiert. Eine der erhaltenen Transformanten wird als B-12288ΔpoxB bezeichnet.

#### Beispiel 10

##### Herstellung von L-Valin mit dem Stamm B-12288ΔpoxB

- Die Bildung von L-Valin durch die Stämme B-12288ΔpoxB und 15 NRRL B-12288 wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g/l  $\text{CaCO}_3$ , 20 g/l Glucose und 50 mg/l 20 Ampicillin beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250  $\mu\text{l}$  dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,018 g/l  $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ , 30 g/l 25  $\text{CaCO}_3$ , 20 g/l Glucose, 5 mg/l Thiamin und 50 mg/l Ampicillin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer 30 Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Valin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem

Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 5 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

5

Tabelle 5

Stamm	OD (660 nm)	L-Valin g/l
NRRL B-12288	5,7	0,95
B-12288 $\Delta$ poxB	5,6	1,05

#### Beschreibung der Figuren

- Figur 1: pMAK705 $\Delta$ poxB (= pMAK705deltapoxB)
- Figur 2: pMW218gdhA
- 10 • Figur 3: pMW219rhtC

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- cat: Chloramphenicolresistenzgen
- 15 rep-ts: temperatursensitive Replikationsregion des Plasmides pSC101
- poxB1: Teil der 5'-Region des poxB-Gens
- poxB2: Teil der 3'-Region des poxB-Gens
- kan: Kanamycinresistenzgen
- 20 gdhA: Glutamat-Dehydrogenase-Gen
- rhtC: Threoninresistenz vermittelndes Gen

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende Bedeutung:

- BamHI: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens*
- BglIII: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus globigii*
- ClaI: Restriktionsendonuklease aus *Caryphanon latum*
- 5 • Ecl136II Restriktionsendonuklease aus *Enterobacter cloacae* RFL136 (= Ecl136)
- EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- HindIII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae*
- 10 • KpnI: Restriktionsendonuklease aus *Klebsiella pneumoniae*
- PstI: Restriktionsendonuklease aus *Providencia stuartii*
- 15 • PvuI: Restriktionsendonuklease aus *Proteus vulgaris*
- SacI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces achromogenes*
- SalI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces albus*
- SmaI: Restriktionsendonuklease aus *Serratia marcescens*
- 20 • XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*
- XhoI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas holcicola*

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von  
L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie  
Enterobacteriaceae.

10 &lt;130&gt; 000613 BT

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

15 &lt;160&gt; 4

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1719

20 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

25 &lt;222&gt; (1)..(1716)

&lt;223&gt; poxB

&lt;400&gt; 1

30 atg aaa caa acg gtt gca gct tat atc gcc aaa aca ctc gaa tcg gca 48  
Met Lys Gln Thr Val Ala Ala Tyr Ile Ala Lys Thr Leu Glu Ser Ala  
1 5 10 1535 ggg gtg aaa cgc atc tgg gga gtc aca ggc gac tct ctg aac ggt ctt 96  
Gly Val Lys Arg Ile Trp Gly Val Thr Gly Asp Ser Leu Asn Gly Leu  
20 25 3040 agt gac agt ctt aat cgc atg ggc acc atc gag tgg atg tcc acc cgc 144  
Ser Asp Ser Leu Asn Arg Met Gly Thr Ile Glu Trp Met Ser Thr Arg  
35 40 4545 cac gaa gaa gtg gcg gcc ttt gcc gct ggc gct gaa gca caa ctt agc 192  
His Glu Glu Val Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ala Gln Leu Ser  
50 55 6050 tta atc aac ggc ctg ttc gat tgc cac cgc aat cac gtt ccg gta ctg 240  
Leu Ile Asn Gly Leu Phe Asp Cys His Arg Asn His Val Pro Val Leu  
85 90 9555 gcg att gcc gct cat att ccc tcc agc gaa att ggc agc ggc tat ttc 336  
Ala Ile Ala Ala His Ile Pro Ser Ser Glu Ile Gly Ser Gly Tyr Phe  
100 105 11060 cag gaa acc cac cca caa gag cta ttc cgc gaa tgt agt cac tat tgc 384  
Gln Glu Thr His Pro Gln Glu Leu Phe Arg Glu Cys Ser His Tyr Cys  
115 120 125

gag	ctg	gtt	tcc	agc	ccg	gag	cag	atc	cca	caa	gta	ctg	gcg	att	gcc	432	
Glu	Leu	Val	Ser	Ser	Pro	Glu	Gln	Ile	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	Ile	Ala		
130						135						140					
5	atg	cgc	aaa	gcg	gtg	ctt	aac	cgt	ggc	gtt	tcg	gtt	gtc	gtg	tta	cca	480
Met	Arg	Lys	Ala	Val	Leu	Asn	Arg	Gly	Val	Ser	Val	Val	Val	Leu	Pro		
145						150					155				160		
10	ggc	gac	gtg	gcf	tta	aaa	cct	gcf	cca	gaa	ggg	gca	acc	atg	cac	tgg	528
Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Lys	Pro	Ala	Pro	Glu	Gly	Ala	Thr	Met	His	Trp		
						165					170				175		
15	tat	cat	gcf	cca	caa	cca	gtc	gtg	acg	ccg	gaa	gaa	gaa	gag	tta	cgc	576
Tyr	His	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	
						180				185				190			
20	aaa	ctg	gcf	caa	ctg	ctg	cgt	tat	tcc	agc	aat	atc	gcc	ctg	atg	tgt	624
Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asn	Ile	Ala	Leu	Met	Cys		
						195			200				205				
25	ggc	agc	ggc	tgc	gcf	ggg	gcf	cat	aaa	gag	tta	gtt	gag	ttt	gcc	ggg	672
Gly	Ser	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	His	Lys	Glu	Leu	Val	Glu	Phe	Ala	Gly		
						210			215			220					
30	aaa	att	aaa	gcf	cct	att	gtt	cat	gcc	ctg	cgc	ggt	aaa	gaa	cat	gtc	720
Lys	Ile	Lys	Ala	Pro	Ile	Val	His	Ala	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	His	Val		
						225			230			235			240		
35	gaa	tac	gat	aat	ccg	tat	gat	gtt	gga	atg	acc	ggg	tta	atc	ggc	tcc	768
Glu	Tyr	Asp	Asn	Pro	Tyr	Asp	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Phe		
						245			250			255					
40	tcg	tca	ggf	tcc	cat	acc	atg	atg	aac	gcc	gac	acg	tta	gtg	ctc		816
Ser	Ser	Gly	Phe	His	Thr	Met	Met	Asn	Ala	Asp	Thr	Leu	Val	Leu	Leu		
						260			265			270					
45	ggc	acg	caa	ttt	ccc	tac	ccg	gcc	tcc	tac	ccg	acc	gat	gcc	aaa	atc	864
Gly	Thr	Gln	Phe	Pro	Tyr	Arg	Ala	Phe	Tyr	Pro	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Ile	
						275			280			285					
50	att	cag	att	gat	atc	aac	cca	gcc	agc	atc	ggc	gct	cac	agc	aag	gtg	912
Ile	Gln	Ile	Asp	Ile	Asn	Pro	Ala	Ser	Ile	Gly	Ala	His	Ser	Lys	Val		
						290			295			300					
55	gat	atg	gca	ctg	gtc	ggc	gat	atc	aag	tcg	act	ctg	cgt	gca	ttg	ctt	960
Asp	Met	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Ile	Lys	Ser	Thr	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu		
						305			310			315			320		
60	cca	ttg	gtg	gaa	gaa	aaa	gcc	gat	cgc	aag	ttt	ctg	gat	aaa	gcf	ctg	1008
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Lys	Ala	Asp	Arg	Lys	Phe	Leu	Asp	Lys	Ala	Leu		
						325			330			335					
55	gaa	gat	tac	cgc	gac	gcc	ccg	aaa	ggg	ctg	gac	gat	tta	gct	aaa	ccg	1056
Glu	Asp	Tyr	Arg	Asp	Ala	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Lys	Pro		
						340			345			350					
60	agc	gag	aaa	gcc	att	cac	ccg	caa	tat	ctg	gcf	cag	caa	att	agt	cat	1104
Ser	Glu	Lys	Ala	Ile	His	Pro	Gln	Tyr	Leu	Ala	Gln	Gln	Ile	Ser	His		
						355			360			365					

ttt gcc gcc gat gac gct att ttc acc tgt gac gtt ggt acg cca acg	1152
Phe Ala Ala Asp Asp Ala Ile Phe Thr Cys Asp Val Gly Thr Pro Thr	
370 375 380	
5 gtg tgg gcg gca cgt tat cta aaa atg aac ggc aag cgt cgc ctg tta	1200
Val Trp Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Met Asn Gly Lys Arg Arg Leu Leu	
385 390 395 400	
10 ggt tcg ttt aac cac ggt tcg atg gct aac gcc atg ccg cag gcg ctg	1248
Gly Ser Phe Asn His Gly Ser Met Ala Asn Ala Met Pro Gln Ala Leu	
405 410 415	
15 ggt gcg cag gcg aca gag cca gaa cgt cag gtg gtc gcc atg tgc ggc	1296
Gly Ala Gln Ala Thr Glu Pro Glu Arg Gln Val Val Ala Met Cys Gly	
420 425 430	
20 gat ggc ggt ttt agc atg ttg atg ggc gat ttc ctc tca gta gtg cag	1344
Asp Gly Gly Phe Ser Met Leu Met Gly Asp Phe Leu Ser Val Val Gln	
435 440 445	
25 atg aaa ctg cca gtg aaa att gtc gtc ttt aac aac agc gtg ctg ggc	1392
Met Lys Leu Pro Val Lys Ile Val Val Phe Asn Asn Ser Val Leu Gly	
450 455 460	
30 ttt gtg gcg atg gag atg aaa gct ggt ggc tat ttg act gac ggc acc	1440
Phe Val Ala Met Glu Met Lys Ala Gly Gly Tyr Leu Thr Asp Gly Thr	
465 470 475 480	
35 gaa cta cac gac aca aac ttt gcc cgc att gcc gaa gcg tgc ggc att	1488
Glu Leu His Asp Thr Asn Phe Ala Arg Ile Ala Glu Ala Cys Gly Ile	
485 490 495	
40 acg ggt atc cgt gta gaa aaa gcg tct gaa gtt gat gaa gcc ctg caa	1536
Thr Gly Ile Arg Val Glu Lys Ala Ser Glu Val Asp Glu Ala Leu Gln	
500 505 510	
45 cgc gcc ttc tcc atc gac ggt ccg gtg ttg gtg gat gtg gtg gtc gcc	1584
Arg Ala Phe Ser Ile Asp Gly Pro Val Leu Val Asp Val Val Val Ala	
515 520 525	
50 aaa gaa gag tta gcc att cca ccg cag atc aaa ctc gaa cag gcc aaa	1632
Lys Glu Leu Ala Ile Pro Pro Gln Ile Lys Leu Glu Gln Ala Lys	
530 535 540	
55 ggt ttc agc ctg tat atg ctg cgc gca atc atc agc gga cgc ggt gat	1680
Gly Phe Ser Leu Tyr Met Leu Arg Ala Ile Ile Ser Gly Arg Gly Asp	
545 550 555 560	
50 gaa gtg atc gaa ctg gcg aaa aca aac tgg cta agg taa	1719
Glu Val Ile Glu Leu Ala Lys Thr Asn Trp Leu Arg	
565 570	
55 <210> 2	
<211> 572	
<212> PRT	
<213> Escherichia coli	
60 <400> 2	
Met Lys Gln Thr Val Ala Ala Tyr Ile Ala Lys Thr Leu Glu Ser Ala	
1 5 10 15	
Gly Val Lys Arg Ile Trp Gly Val Thr Gly Asp Ser Leu Asn Gly Leu	

	20	25	30
	Ser Asp Ser Leu Asn Arg Met Gly	Thr Ile Glu Trp Met Ser Thr Arg	
5	35 35	40 45	
	His Glu Glu Val Ala Ala Phe Ala Ala Gly	Ala Glu Ala Gln Leu Ser	
	50 50	55 60	
10	Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Gly Ser Cys	Gly Pro Gly Asn Leu His	
	65 65 70	75 80	
	Leu Ile Asn Gly Leu Phe Asp Cys His Arg Asn His Val Pro Val Leu		
	85 85 90	90 95	
15	Ala Ile Ala Ala His Ile Pro Ser Ser Glu Ile Gly Ser Gly Tyr Phe		
	100 100 105	105 110	
	Gln Glu Thr His Pro Gln Glu Leu Phe Arg Glu Cys Ser His Tyr Cys		
20	115 115 120	120 125	
	Glu Leu Val Ser Ser Pro Glu Gln Ile Pro Gln Val Leu Ala Ile Ala		
	130 130 135	135 140	
25	Met Arg Lys Ala Val Leu Asn Arg Gly Val Ser Val Val Val Leu Pro		
	145 145 150	155 160	
	Gly Asp Val Ala Leu Lys Pro Ala Pro Glu Gly Ala Thr Met His Trp		
	165 165 170	170 175	
30	Tyr His Ala Pro Gln Pro Val Val Thr Pro Glu Glu Glu Leu Arg		
	180 180 185	185 190	
	Lys Leu Ala Gln Leu Leu Arg Tyr Ser Ser Asn Ile Ala Leu Met Cys		
35	195 195 200	200 205	
	Gly Ser Gly Cys Ala Gly Ala His Lys Glu Leu Val Glu Phe Ala Gly		
	210 210 215	215 220	
40	Lys Ile Lys Ala Pro Ile Val His Ala Leu Arg Gly Lys Glu His Val		
	225 225 230	235 240	
	Glu Tyr Asp Asn Pro Tyr Asp Val Gly Met Thr Gly Leu Ile Gly Phe		
	245 245 250	250 255	
45	Ser Ser Gly Phe His Thr Met Met Asn Ala Asp Thr Leu Val Leu Leu		
	260 260 265	265 270	
	Gly Thr Gln Phe Pro Tyr Arg Ala Phe Tyr Pro Thr Asp Ala Lys Ile		
50	275 275 280	280 285	
	Ile Gln Ile Asp Ile Asn Pro Ala Ser Ile Gly Ala His Ser Lys Val		
	290 290 295	295 300	
55	Asp Met Ala Leu Val Gly Asp Ile Lys Ser Thr Leu Arg Ala Leu Leu		
	305 305 310	315 320	
	Pro Leu Val Glu Glu Lys Ala Asp Arg Lys Phe Leu Asp Lys Ala Leu		
	325 325 330	330 335	
60	Glu Asp Tyr Arg Asp Ala Arg Lys Gly Leu Asp Asp Leu Ala Lys Pro		
	340 340 345	345 350	
	Ser Glu Lys Ala Ile His Pro Gln Tyr Leu Ala Gln Gln Ile Ser His		

	355	360	365
	Phe Ala Ala Asp Asp Ala Ile Phe Thr Cys Asp Val Gly Thr Pro Thr		
	370	375	380
5	Val Trp Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Met Asn Gly Lys Arg Arg Leu Leu		
	385	390	395
	Gly Ser Phe Asn His Gly Ser Met Ala Asn Ala Met Pro Gln Ala Leu		
10	405	410	415
	Gly Ala Gln Ala Thr Glu Pro Glu Arg Gln Val Val Ala Met Cys Gly		
	420	425	430
15	Asp Gly Gly Phe Ser Met Leu Met Gly Asp Phe Leu Ser Val Val Gln		
	435	440	445
	Met Lys Leu Pro Val Lys Ile Val Val Phe Asn Asn Ser Val Leu Gly		
20	450	455	460
	Phe Val Ala Met Glu Met Lys Ala Gly Gly Tyr Leu Thr Asp Gly Thr		
	465	470	475
	Glu Leu His Asp Thr Asn Phe Ala Arg Ile Ala Glu Ala Cys Gly Ile		
25	485	490	495
	Thr Gly Ile Arg Val Glu Lys Ala Ser Glu Val Asp Glu Ala Leu Gln		
	500	505	510
30	Arg Ala Phe Ser Ile Asp Gly Pro Val Leu Val Asp Val Val Val Ala		
	515	520	525
	Lys Glu Glu Leu Ala Ile Pro Pro Gln Ile Lys Leu Glu Gln Ala Lys		
35	530	535	540
	Gly Phe Ser Leu Tyr Met Leu Arg Ala Ile Ile Ser Gly Arg Gly Asp		
	545	550	555
	Glu Val Ile Glu Leu Ala Lys Thr Asn Trp Leu Arg		
40	565	570	

45 <210> 3  
 <211> 1454  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
  
 50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1454)  
 <223> Mutagene DNA  
  
 55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(56)  
 <223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz  
  
 60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (57)..(577)  
 <223> Teil der 5'-Region (poxB1) des poxB-Gens

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (578)..(646)
<223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (647)..(1398)
<223> Teil der 3'-Region (poxB2) des poxB-Gens
10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1399)..(1454)
<223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz
15
<400> 3
ctagatgcat gctcgagcgg ccgccagtgt gatggatatc tgcagaattc gcccttctga 60
acgtcttag tgacagtctt aatcgcatgg gcaccatcga gtggatgtcc accccgccacg 120
aagaagtggc ggccttgcc gctggcgtct aagcacaact tagcggagaa ctggcggtct 180
20
gcgccggatc gtgcggccccc ggcacacctgc acttaatcaa cggcctgttc gattgccacc 240
gcaatcacgt tccggtaactg gcgattgccc ctcataattcc ctccagcggaa attggcagcg 300
gctatttcca ggaaaccaccc cacaagagc tattccgcga atgttagtcac tattgcgagc 360
tggtttccag cccggagcag atcccacaag tactggcgt tgccatgcgc aaagcgggtgc 420
ttaaccgtgg cgtttccgtt gtctgttac caggcggacgt ggcgttaaaa cctgcggccag 480
25
aaggggcaac catgcactgg tatcatgcgc cacaaccagt cgtgacgccc gaagaagaag 540
agttaacgaa actggcggaa ctgctgcgtt attccaggcc taagggcggaa ttccagcaca 600
ctggcggcccg ttactagtgg atccggagatc tgcagaattc gcccttctgc gtgcattgtct 660
tccattgggtg gaagaaaaag ccgatcgca gtttctggat aaagcggctgg aagattaccg 720
cgacgccccgc aaagggtctgg acgatttagc taaaccgagc gagaagcca ttcacccgca 780
30
atatctggcg cagcaaatta gtcattttgc cgccgatgac gctattttca cctgtgacgt 840
tggtagcaca acgggtgtgg cgccacgtta tctaaaaatg aacggcaagc gtgcgttgc 900
agtttcgttt aaccacgggtt cgatggctaa cgccatgccc caggcgttgg gtgcgcaggg 960
gacagagcca gaacgtcagg tggtcgcccgtt gtcggcgtt ggcgttttgc gcatgttgc 1020
ggcgatttc ctctcgttag tgcagatgaa actgcccgtt aaaaattgtcg tctttaaacaa 1080
35
cagcgtgtcg ggctttgtgg cgatggagat gaaagctggt ggcgttttgc ctgacggcac 1140
cgaactacac gacacaaact ttggccgtt tgccgaagcg tgcggcattt cgggtatccg 1200
tgttagaaaaaa gctgtctgaag ttgtgaagc cctgcaacgc gccttctcca tcgacgggtcc 1260
gggtttgggtg gatgtgtgg tcgccaaaga agagtttagcc attccaccgc agatcaaact 1320
cgaaacaggcc aaagggttca gctgttatat gctgcgcga atcatcagcg gacgcgggtga 1380
40
tgaagtgtatc gaactggcaaa gggcgaattc cagcacactg gccggccgttta ctagtggatc 1440
cgagctcggtt acca 1454

<210> 4
45 <211> 1448
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Startkodon des delta poxB-Allels

<220>
55 <221> misc_feature
<222> (1)..(605)
<223> 5'-Region des delta poxB-Allels

<220>
60 <221> misc_feature
<222> (606)..(674)
<223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (675)..(1445)
<223> 3'-Region des delta poxB-Allels
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (1446)..(1448)
<223> Stopkodon des delta poxB-Allels
10
<400> 4
atgaaacaaa cggttgcagc ttatatcgcc aaaacactcg aatcggcaagg ggtgaaacgc 60
atctggggag tcacaggcga ctctctgaac ggtcttagtg acagtcttaa tcgcattggc 120
accatcgagt ggtatgtccac ccgccacgaa gaagtggcgg cctttccgc tggcgtgaa 180
15
gcacaactta gcggagaact ggcggctctgc gccggatcggt gcggccccgg caacctgcac 240
ttaatcaacg gcctgttcga ttgcaccgc aatcacgttc cggtaactggtc gattggcgt 300
catattccct ccagcgaat tggcagcggc tattttcagg aaacccaccc acaagagcta 360
ttccgcgaat gtatgtacta ttgcggactg gtttccagcc cggagcagat cccacaagta 420
ctggcgattt ccatgcgcaaa agcgggtctt aaccgtggcg tttcggttgc cgttttacca 480
20
ggcgcacgtgg cgttaaaaacc tggcccgaa gggcaaccca tgcactggta tcacgcgcca 540
caaccagtcg tgacgcggg agaagaagaa ttacgcaccc tggcgcacact gctgcgttat 600
tccaggccta agggcgaatt ccagcacact ggcggccgtt actagtggat ccgagatctg 660
cagaattcgc ctttctcggt gcatgttgc aattgttgcggtt cattgtggaa agaaaaaagcc gatgcgaagt 720
ttctggataa agcgttggaa gattaccgcg acgcccgc aagggtggac gatttagcta 780
25
aaccgagcga gaaagccatt caccgcattt atctggcgca gcaaaatttttgcatttgc 840
ccgatgacgc tattttcacc tttgtacgtt gttacgcaccc ggtgtggggc gcacgttac 900
taaaaatgaa cggcaagcgt cggctgttag gttcgtttaa ccacgggttcg atggctaacg 960
ccatgcgcga ggcgttgggt ggcaggcga cagagccaga acgtcaggtt gtcgcattgt 1020
gcggcgatgg cgggttttagc atgttgcgtt gtcgttgcgtt ctttgcgttgc atggatgttgc 1080
30
tgccagtgaa aattgtcgac tttaacaaca gtcgtgtggg ctttgcgttgc atggatgttgc 1140
aagctgggtgg ctatgttgcgtt gacggcaccg aactacacga cacaactt gcccgcattt 1200
ccgaagcgtt cggcattacg ggtatccgtt tagaaaaagc gtctgaaggat gatgaaggccc 1260
tgcacgcgc ctttctccatc gacggtccgg ttttgcgttgc ttttgcgttgc gccaagaag 1320
agtttagccat tccaccgcg atcaactcg aacaggccaa aggtttcagc ctgttatatgc 1380
35
tgcgcgcaat catcagcggc cgcgggtatc aagtgtatcgacttgcgaa acaaactggc 1440
taaggtaa

```

## Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:
  - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man zumindest das *poxB*-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
  - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
  - c) Isolieren der L-Aminosäure.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß L-Threonin, L-Valin oder L-Lysin hergestellt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das *poxB*-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.

7.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende  
gdhA-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h  
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie  
Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man  
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt  
aus der Gruppe:

10 8.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-  
Gen,

8.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-  
Gen,

8.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa,

15 8.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,  
und

8.5 das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
kodierende pckA-Gen,

20 abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die  
Expression verringert.

9. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h  
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Threonin den Stamm MG442ΔpoxB transformiert mit  
dem Plasmid pMW218gdhA, dargestellt in Figur 2,  
25 einsetzt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h  
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Threonin den Stamm MG442ΔpoxB transformiert mit  
dem Plasmid pMW219rhtC, dargestellt in Figur 3,  
30 einsetzt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Lysin den Stamm TOC21RΔpoxB einsetzt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Valin den Stamm B-12288ΔpoxB einsetzt.
13. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das poxB-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet sind, die eine Resistenz gegen  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure und gegebenenfalls eine kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-Isoleucin aufweisen.
14. Escherichia coli K-12 Stamm MG442ΔpoxB hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) unter der Nr. DSM 13762.
15. Plasmid pMAK705ΔpoxB, das Teile der 5'-und der 3'-Region des poxB-Gens, entsprechend SEQ ID No. 3, enthält, dargestellt in Figur 1.
16. Plasmid pMW218gdhA dargestellt in Figur 2.
17. Plasmid pMW219rhtC dargestellt in Figur 3.
18. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der Familie Enterobactericeae, enthaltend eine für die 5'- und 3'-Region des poxB-Gens kodierende Polynukleotidsequenz dargestellt in SEQ ID No. 4 insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für die ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens.
19. L-Threonin produzierende Stämme der Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine Mutation im poxB-Gen entsprechend SEQ ID No. 4.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobactericeae, in denen man zumindest das *poxB*-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
- 10 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figure 1:

5

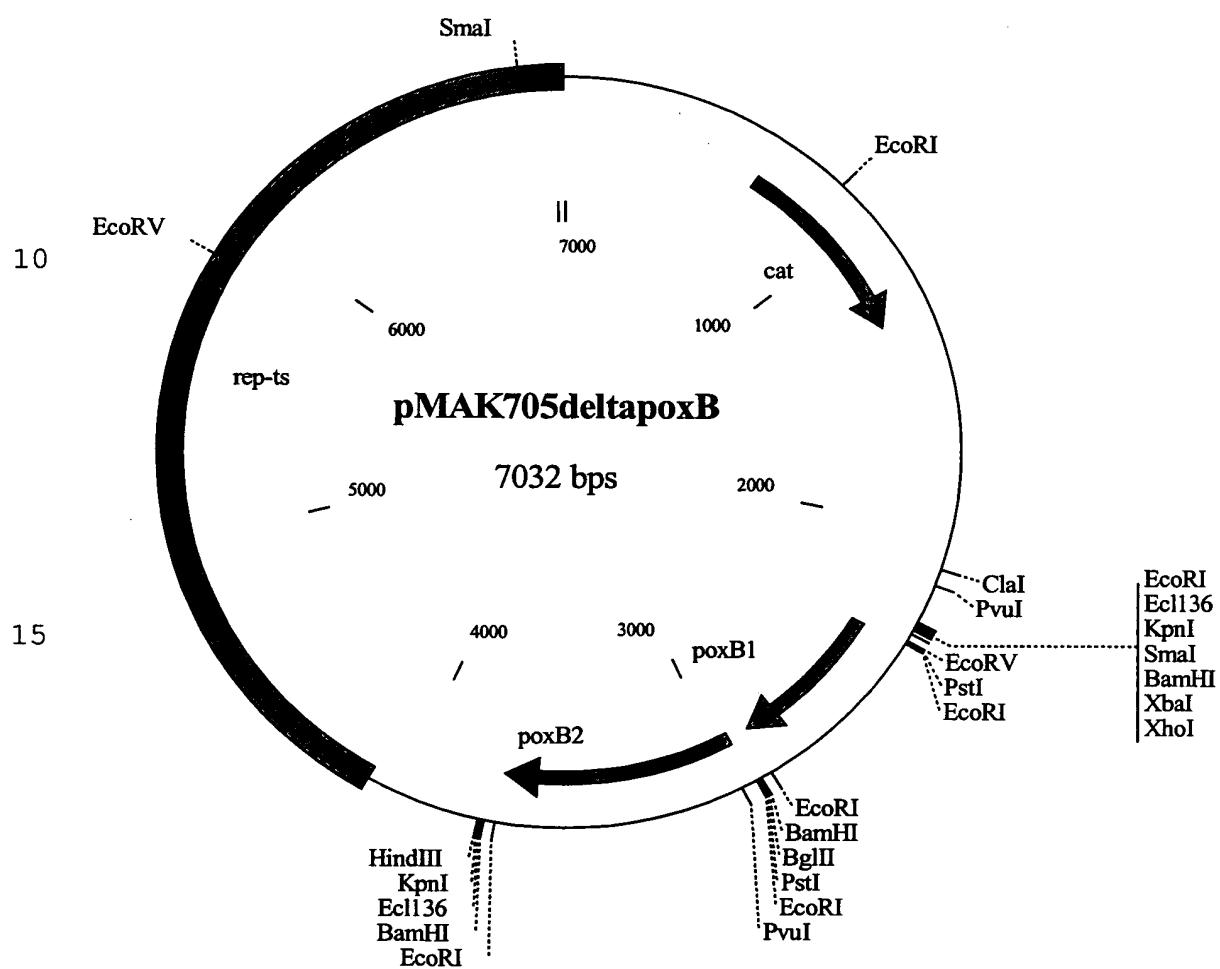


Figure 2:

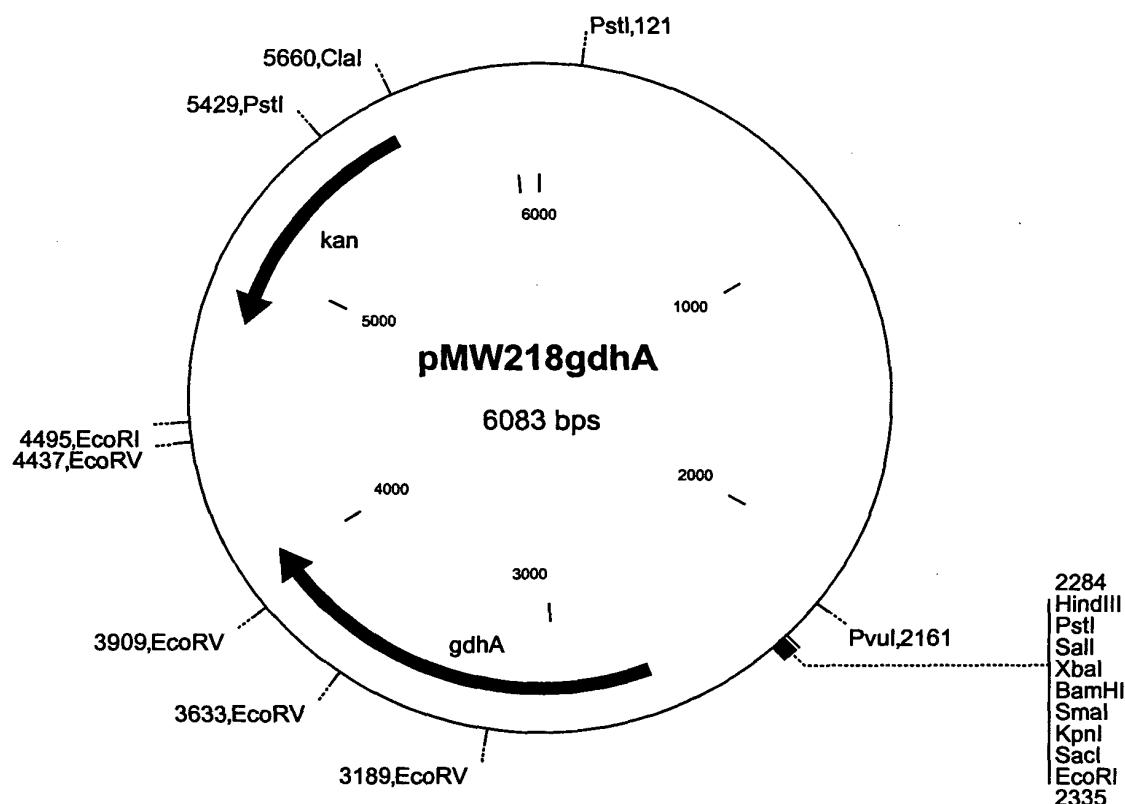
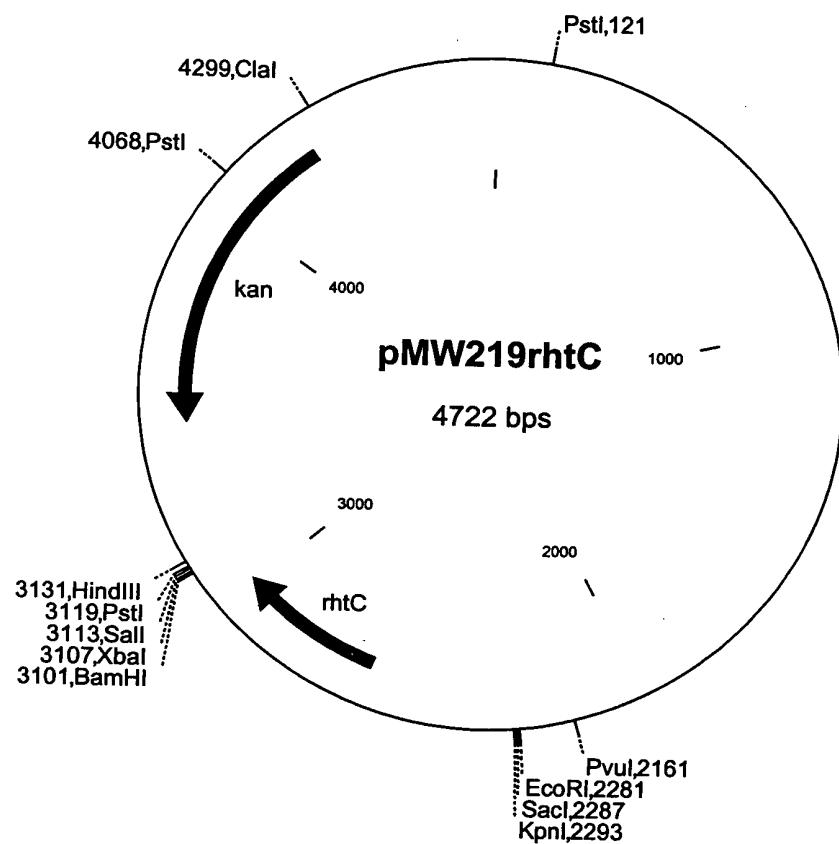


Figure 3:





Creation date: 19-08-2003  
Indexing Officer: BBROWN8 - BARBARA BROWN  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 10076416

Legal Date: 03-04-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	CTMS	2

Total number of pages: 2

Remarks:

Order of re-scan issued on .....